

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-078761

(43)Date of publication of application : 27.03.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/00
C01G 49/08

(21)Application number : 11-253158

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 07.09.1999

(72)Inventor : DAIMON KATSUYA
KOMAI SHIGERU
TAKARADA YUTAKA

(54) CARRIER COMPOSED OF NUCLEIC ACID-BINDING MAGNETIC SILICA PARTICLE CARRIER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a nucleic acid-binding magnetic silica particle carrier capable of efficiently acquiring nucleic acids from a specimen expected to contain the nucleic acids and enabling automatic mechanization to be performed.

SOLUTION: This silica particle carrier is a superparamagnetic metal oxide the surface of which is coated with silica, and has a particle diameter, a pore diameter and a pore volume of 0.5-15.0 μ m, 50-500 nm and 200-5,000 mm³/g, respectively.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 26.03.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-78761

(P2001-78761A)

(43) 公開日 平成13年3月27日 (2001.3.27)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テームコード* (参考)

C 1 2 N 15/00

C 1 2 N 15/00

4 B 0 2 4

C 0 1 G 49/08

C 0 1 G 49/08

A 4 G 0 0 2

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平11-253158

(22) 出願日 平成11年9月7日 (1999.9.7)

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 大門 克哉

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(72) 発明者 駒井 茂

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(72) 発明者 宝田 裕

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 HA12

4G002 AA04 AA12 AB05 AE02

(54) 【発明の名称】 核酸結合性磁性シリカ粒子担体

(57) 【要約】

【課題】核酸を含有すると考えられる試料から、効率良く、しかも自動機械化を可能とするような核酸結合性磁性シリカ粒子担体を提供する。

【解決手段】表面をシリカで被覆した超常磁性金属酸化物であるシリカ粒子担体であって、該シリカ粒子担体が0.5~15.0 μ mの粒子直径、50~500nmの細孔直径および200~5000mm³/gの細孔容積とを有することを特徴とする核酸結合性磁性シリカ粒子担体。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 表面をシリカで被覆した超常磁性金属酸化物である磁性シリカ粒子からなる核酸結合性磁性シリカ粒子担体であって、該磁性シリカ粒子が0.5～15.0 μ mの粒子直径、50～500nmの細孔直径および200～5000mm³/gの細孔容積とを有することを特徴とする核酸結合性磁性シリカ粒子担体。

【請求項2】 該磁性シリカ粒子が1.0～10.0 μ mの粒子直径を有する請求項1記載の核酸結合性磁性シリカ粒子担体。

【請求項3】 該磁性シリカ粒子中に、超常磁性金属酸化物として10～60%の酸化鉄を含有する請求項1または2に記載の核酸結合性磁性シリカ粒子担体。

【請求項4】 該磁性シリカ粒子が5～800m²/gの比表面積を有する請求項1～3のいずれかに記載の核酸結合性磁性シリカ粒子担体。

【請求項5】 該磁性シリカ粒子を用いて抽出もしくは単離される核酸がDNAおよび/またはRNAである請求項1～4のいずれかに記載の核酸結合性磁性シリカ粒子担体。

【請求項6】 請求項1～5のいずれかに記載の核酸結合性磁性シリカ粒子担体、核酸を該核酸結合性磁性シリカ粒子担体に吸着させるための核酸抽出溶液、および核酸を含有する生物試料から核酸を遊離させ該核酸結合性磁性シリカ粒子担体に結合させる働きを有する核酸抽出溶液を含んでなることを特徴とする核酸抽出用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸を含有すると考えられる材料から核酸を抽出し単離する際に使用することのできる核酸結合性磁性シリカ粒子担体に関する。より詳細には、0.5～15.0 μ mの粒子直径、50～500nmの細孔直径および200～5000mm³/gの細孔容積とを有する核酸結合性磁性シリカ粒子担体に関する。

【0002】

【従来の技術】近年の遺伝子工学や分子生物学の飛躍的な進歩により、感染症や遺伝子疾患等について、DNAおよびRNAレベルでの解析が可能になった。特に、PCR法 (Science 230: 1350-1354, 1985) やNASBA法 (Nature 350, 91-92(1991)、特許第2648802号公報および特許第2650159号公報) 等に代表される核酸増幅方法の発明により、従来であれば検出が非常に困難であった極微量の核酸の検出が可能となり、遺伝子解析が容易になった。ただし、生物試料中の核酸を、必要であれば増幅し、検出するためには、試料中に含まれる核酸を選択的に取り出す必要がある。これは、通常生物試料中には核酸以外の夾雑物質、例えばタンパク質、脂質、糖類等が大量に含まれており、これらが増幅や検出に悪影響を及ぼす可能性が高い。そのた

め、予め試料中の夾雑物質を除き、核酸を抽出する操作が必要となる。

【0003】試料中から核酸を抽出し精製する方法は古くから様々な手法で行われてきた。その代表的なものとしては、フェノール/クロロホルム抽出法 (Biochimica et Biophysica acta 72: 619-629, 1963)、アルカリSDS法 (Nucleic Acid Research 7: 1513-1523, 1979) 等の液相で行う方法がある。これらは実験室スケールで汎用されるが、有害で廃棄の困難なフェノールやクロロホルムのような有機溶剤の他、危険物である水酸化ナトリウムなどを使用するため、技術的には熟練を要し、再現性良く実施することは容易でない。また核酸の単離に核酸結合用担体を用いる方法として、ガラス粒子とヨウ化ナトリウム溶液を使用する方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76-2: 615-619, 1979)、ハイドロキシアパタイトを用いる方法 (特開昭63-263093号公報) 等がある。これらの方法は有害な有機溶剤等は使用しないものの、工程中に遠心分離操作を多く含むため多数の試料を一度に処理することが困難で、核酸を単離するのに長時間かかるという問題を含んでいる。従って、上記の核酸単離方法は有機溶剤やアルカリなどの危険な試薬を使用すること、遠心分離操作を必要とし、多数検体の処理が難しいことなどの難点がある。そしてさらに、抽出および単離工程の自動機械化に際して大きな問題を含む。多数の検体を再現性良く処理し、更に人的コストを低減させるためには、核酸抽出法の自動化は今後不可欠のものとなる。

【0004】この自動機械化を目指したものとして、シリカ粒子とカオトロピックイオンを用いた方法 (J. Clinical Microbiology 28-3: 495-503(1990)、特許第2680462号公報) がある。この方法は、核酸結合性のシリカ粒子と試料中の核酸を遊離する能力を有するカオトロピックイオン溶液とを試料と混合し、核酸をシリカ粒子に結合させ、夾雑物質を洗浄により除去した後、シリカ粒子に結合した核酸を回収するものである。この方法は、DNAのみでなく、より不安定であるRNAの抽出にも好適であり、また純度の高い核酸が得られるという点で非常に優れている。ただしこの核酸が結合した粒子の洗浄については遠心分離またはフィルターなどを使用した過渡などを行う必要があり、機械化の際に工程が複雑となる恐れが高い。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記の問題点を解決するためになされたものであり、核酸を含有すると考えられる材料から核酸を抽出および単離する際に、臨床検体のような多量の夾雑物質を含む試料から、効率よくしかも自動機械化を可能にする核酸結合性磁性シリカ粒子担体を提供する。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、これらの

課題を解決するべく鋭意研究を進めた結果、粒子担体を使用し生物材料から核酸を抽出し単離する際、臨床検体のような多量の不純物を含む試料から効率よく核酸を抽出するためには、磁性シリカ粒子が少なくとも50 nmの細孔直径と200 mm³/gの細孔容積を有することが有効であることを見出し、本発明に到達した。

【0007】すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

(1) 表面をシリカで被覆した超常磁性金属酸化物である磁性シリカ粒子からなる核酸結合性磁性シリカ粒子担体であって、該磁性シリカ粒子が0.5～15.0 μmの粒子直径、50～500 nmの細孔直径および200～5000 mm³/gの細孔容積とを有することを特徴とする核酸結合性磁性シリカ粒子担体。

(2) 該磁性シリカ粒子が1.0～10.0 μmの粒子直径を有し、かつほぼ完全な球状である(1)の核酸結合性磁性シリカ粒子担体。

(3) 該磁性シリカ粒子中に、超常磁性金属酸化物として10～60%の酸化鉄を含有する(1)または(2)の核酸結合性磁性シリカ粒子担体。

(4) 該磁性シリカ粒子が5～800 m²/gの比表面積を有する(1)～(3)のいずれかの核酸結合性磁性シリカ粒子担体。

(5) 該磁性シリカ粒子を用いて抽出もしくは単離される核酸がDNAおよび/またはRNAである(1)～

(4)のいずれかの核酸結合性磁性シリカ粒子担体。

(6) (1)～(5)のいずれかの核酸結合性磁性シリカ粒子担体、核酸を該核酸結合性磁性シリカ粒子担体に吸着させるための核酸抽出溶液、および核酸を含有する生物試料から核酸を遊離させ該核酸結合性磁性シリカ粒子担体に結合させる働きを有する核酸抽出溶液を含んでなることを特徴とする核酸抽出用試薬。

【0008】

【発明の実施の形態】次に本発明において使用する用語を定義し、その測定法を説明する。表面積とは、粒子担体の全表面上の面積を示す。また微小径粒子においては、粒子1個当たりの表面積ではなく、単位重量(例えば1 g)当たりの表面積で示すことが多く、これを比表面積という。また、外部表面積とは、担体の表面に位置する表面積をいう。細孔とは、粒子表面に存在する微細な空洞を示し、細孔容積とは、細孔により構成される空間の容積を示す。また、表面細孔直径とは、担体上に存在する微小な細孔の直径であり、微小径の粒子では平均の直径がよく用いられる。粒子直径とは、分散粒子の形を球形と仮定した場合の直径を示す。一般に、多孔質の磁性シリカ粒子担体においては、細孔部分の直径である細孔直径と、粒子内部の容積となる細孔容積が存在する。そして本発明においては、これらの細孔直径と細孔容積が試料中の核酸の回収効率に影響することを見出したものである。

【0009】すなわち本発明においては、磁性シリカ粒子担体が少なくとも50 nmの細孔直径と、200 mm³/gの細孔容積を有することが必要である。細孔直径および細孔容積がより大きい粒子を使用することにより、核酸の回収量を高めることができる。細孔直径が50 nm未満、細孔容積が200 mm³/g未満であると、試料中の夾雑物質等の影響により、目的とする核酸が粒子表面に結合、吸着できないという問題を生じる。

【0010】本発明において、粒子の細孔直径および細孔容積についての解析は、水銀圧入法により実施した。この方法は、水銀はほとんどの物質の細孔壁を濡らさないため、強制的に加圧しないと細孔中に水銀が浸入していかないという物理的原理に基づいている。すなわち、試料を取り囲んだ水銀を周囲より一様に圧力をかけ、順次昇圧していくと、水銀は細孔径の比較的大きい細孔から、小さい細孔へと浸入していく。ここで細孔が半径rの円筒状であると仮定すると、圧力pをかけて水銀を押し込もうとする力 $\pi r^2 P$ と、浸入しようとする水銀を外へ押し出そうとする力 $-2\pi r \cdot \gamma \cos \theta$ が平衡になり、水銀は次式で決まる細孔半径rより大きい細孔に浸入する。

$$p r = -2 \gamma \cos \theta \quad (1)$$

ここで、

P: 圧力

r: 細孔径

γ : 水銀の表面張力

θ : 水銀と試料の接触角 ($90^\circ < \theta < 180^\circ$)

である。上記(1)式はWashburn式と呼ばれ、右辺は測定物質固有の定数となり、圧力または細孔半径に対する水銀の浸入量となる。また水銀の浸入量は半径rより大きい細孔の累積容積を示す。

【0011】次に、細孔の累積比表面積Sを考える場合、ある細孔半径r、深さlの円筒細孔がn個存在したとすると、比表面積の増加量は、

$$dS = 2\pi r l \cdot n \quad (2)$$

また、細孔容積の増加量は、

$$dV = \pi r^2 l \cdot n \quad (3)$$

であり、(2)式と(3)式から、

$$dS = (2/r) dV$$

従って、累積比表面積は、

$$S = (2/r) \int dV$$

となる。

【0012】本発明の核酸結合性磁性シリカ粒子は以下のような構造を有している。すなわち、下記超常磁性金属酸化物の表面がシリカで被覆されており、そして、さらに微小なシリカ粒子で構成される無機多孔性壁物質で複合されている。この磁性シリカ粒子は、ほぼ完全な球状であることが好ましい。核酸とシリカ粒子とは、シリカ表面の水酸基と核酸の塩基との間で生じる水素結合により結合される。

【0013】本発明で用いられる超常磁性金属酸化物とは、磁場変化度に応答するが、永久磁化はされず、残留磁化が小さい金属酸化物をいう。好ましい超常磁性金属酸化物としては、酸化鉄が挙げられる。この酸化鉄としては、四三酸化鉄 (Fe_3O_4) および四三酸化鉄を徐々に酸化して得られる r 型三二酸化鉄 ($r\text{Fe}_2\text{O}_3$) 等が用いられる。この四三酸化鉄は残留磁気が小さく、さらに好ましい表面構造 (ほぼ球形) を有するため、磁気分離および再分散のサイクルを反復することが可能である。四三酸化鉄を含有する磁性シリカ粒子は弱酸性の水溶液中で安定であり、2年以上も貯蔵可能である。

【0014】本発明の核酸結合性磁性シリカ粒子中に含まれる超常磁性金属酸化物の重量は、磁極の強さにもよるが10～60重量%が好ましく、さらに好ましくは20～40重量%である。この好ましい範囲内では、磁性担体は市販の磁石を使用して迅速に分離できる。なお、本発明においてシリカとは、 SiO_2 結晶および他の形態の酸化ケイ素分子、 SiO_2 から構成されるケイソウ植物の骨格ならびに無定型酸化ケイ素を含む。

【0015】本発明磁性シリカ粒子は下記性質を有するものが最も好ましい。

- (1) 担体は超常磁性酸化鉄を含む磁性シリカ粒子である。
- (2) 磁性シリカ粒子の外部表面積は少なくとも $10\text{ m}^2/\text{g}$ である。
- (3) 磁性シリカ粒子は、その表面がシリカで被覆されている超常磁性金属酸化物を微小なシリカ粒子で構成される無機多孔性壁物質で複合してなる。
- (4) 超常磁性酸化鉄の重量は10～60重量%である。
- (5) 磁性シリカ粒子の比表面積は $10\sim800\text{ m}^2/\text{g}$ である。
- (6) 磁性シリカ粒子の表面細孔直径は $50\sim500\text{ nm}$ である。
- (7) 磁性シリカ粒子の細孔容積は $200\sim5000\text{ mm}^3/\text{g}$ である。
- (8) 磁性シリカ粒子の粒子径は $0.5\sim15.0\text{ }\mu\text{m}$ である。

【0016】本発明の磁性シリカ粒子は、例えば特開平6-47273号公報の記載される方法により製造することができる。例えば、四三酸化鉄をテトラエトキシシランのアルコール溶液に添加し、超音波分散機により分散湿潤させる。これにテトラエトキシシランの加水分解触媒を加え、超音波分散させながら四三酸化鉄の表面にシリカを沈着させる。このようにして得られた分散液にケイ素ナトリウムを加え、有機溶媒および界面活性剤 (ソルビタンモノステアレート、トルエン溶液) を加えて乳化し、W/O型エマルジョンを形成させる。この乳濁液を硫酸アンモニウム水溶液に添加し、十分攪拌させるその後、逕過分離、水洗、アルコール沈殿を行い乾燥させることにより、所望の球状シリカ粒子が得られる。

【0017】本発明の核酸結合性磁性シリカ粒子は、核酸を含有する生物試料および、核酸を粒子表面に吸着により結合させる能力を持った核酸抽出溶液とともに使用する。この核酸抽出溶液は、生物試料中の核酸を含む細胞等を破壊し、核酸を露出させ、そして、この核酸を磁性シリカ粒子に結合させる働きを有する溶液である。このような溶液としては、好ましくはカオトロピック物質のようなシリカ粒子表面の疎水性を高める物質が選択され、さらに好ましくはグアニジン (イソ) チオシアン酸塩および/またはグアニジン塩酸塩のような核酸分解酵素の阻害活性を有する化合物の溶液が使用できる。

【0018】カオトロピック物質としては、具体的にはグアニジンチオシアン酸塩、グアニジン塩酸塩、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、尿素等が挙げられる。特に、RNAを分解するリボヌクレアーゼに対する阻害効果の大きなグアニジンチオシアン酸塩あるいはグアニジン塩酸塩の使用が好ましい。これらのカオトロピック物質の使用濃度は、用いられるカオトロピック物質により異なるが、通常 $1.0\sim8.0\text{ mol/l}$ 、好ましくは $4.0\sim7.0\text{ mol/l}$ であり、例えば、グアニジン塩酸塩を使用する場合は $4.0\sim7.5\text{ mol/l}$ である。また、グアニジンチオシアン酸塩を使用する場合には $3.0\sim5.5\text{ mol/l}$ の範囲である。

【0019】本発明の核酸結合性磁性シリカ粒子を含む核酸抽出溶液には、緩衝剤を含有させることが好ましい。これは予め核酸抽出溶液に含まれていても、また細胞を溶解した後に緩衝液として添加してもよい。該緩衝剤としては、一般に使用されるものであれば特に限定されないが、中性付近、すなわち $\text{pH } 5.0\sim9.0$ において緩衝能を有するものが好ましい。例えば、トリス塩酸塩、四ホウ酸ナトリウム塩酸、リン酸二水素カリウム-四ホウ酸ナトリウム緩衝液等が挙げられる。その濃度としては $1\sim500\text{ mmol/l}$ 、 pH としては $6.0\sim9.0$ の範囲が好適である。

【0020】また、核酸抽出溶液には、細胞膜の破壊あるいは細胞中に含まれるタンパク質を変性させる目的で界面活性剤を含有させてもよい。この界面活性剤としては、一般に細胞等からの核酸抽出に使用されるものであれば、特に限定されないが、具体的には、トリトン系界面活性剤およびツイーン系界面活性剤等の非イオン界面活性剤、N-ラウロイルサルコシナトリウム等の陰イオン界面活性剤が挙げられる。本発明においては、特に非イオン界面活性剤を $0.1\sim2.0\%$ の範囲で使用するものが好ましい。さらに、上記核酸抽出溶液には試料中に含まれるタンパク質、特にリボヌクレアーゼを変性、失活させる目的で、2-メルカプトエタノールあるいはジチオスレイトール等の還元剤を含有させることが好ましい。

【0021】本発明において必要により使用する洗浄液とは、核酸結合性担体から核酸の溶離を促進することな

く、かつタンパク質、糖類、脂質の固相への結合を妨げるものであれば特に限定されない。具体的には、4.0～7.5mol/lグアニジン塩酸塩溶液あるいは40～100%エタノールで洗浄することが好ましい。また、初めに溶解・吸着工程にて使用した抽出溶液を洗浄液として使用すると、ゲノムDNAとタンパク質の除去に有効である。このとき、続いて40～100%エタノールで洗浄することが好ましい。

【0022】本発明における核酸の結合した核酸結合性担体から核酸を溶出する核酸溶出液とは、核酸結合性担体から核酸の溶離を促進するものであれば、特に限定されない。具体的には、水あるいはTE緩衝液(10mmol/lトリス-塩酸塩、1.0mmol/lEDTA; pH8.0)が好ましい。

【0023】この核酸-磁性シリカ粒子複合体を形成する際、夾雑物を多量に含む生物試料、例えば血液のような検体を処理する場合、核試料由来の物質が磁性シリカ粒子の周囲に付着し、核酸の結合を妨げる傾向にある。実際、夾雑物が多い試料ほど核酸の回収能力が低下する。この問題を解決するため、本発明においては、細孔直径および細孔容積がより大きい粒子を使用することにより、上記試料由来の夾雑物質が粒子に付着しても、核酸の結合に影響が出にくく、従って高い回収率を維持することが可能となる。

【0024】本発明の核酸抽出用試薬は、(1)超常磁性金属酸化物を含む磁性シリカ粒子である核酸結合性磁性担体であって、該磁性シリカ粒子が50～500nmの細孔直径と、200～5000mm³/gの細孔容積を有する核酸結合性磁性担体と、上述したような(2)核酸を核粒子に吸着させるための核酸抽出溶液、および(3)核酸溶出溶液とを少なくとも含む。その組成比は使用目的に応じて選択されるが、その一例としては、(1)約1～200μl、(2)約0.1～10.0mlおよび(3)約10～500μlである。

【0025】本発明における核酸結合性磁性シリカ粒子担体を核酸を含有する試料とともに核酸吸着用溶液中に添加し、磁性シリカ粒子-核酸複合体を形成する。本発明の磁性シリカ粒子を用いた核酸単離方法としては、好ましくは下記工程を含む。

(a)核酸結合性担体、核酸を含有する試料および核酸を核酸結合性担体に吸着させるための核酸抽出溶液を混合して、核酸を核酸結合性担体に結合させる工程(吸着工程)、(b)核酸が結合した核酸結合性担体を液体から分離し、必要により洗浄する工程(分離工程)および(c)核酸結合性担体-核酸複合体から核酸を溶出する工程(溶出工程)

【0026】ここで、核酸を含有する試料とは、全血、血清、血漿、尿、唾液、体液などの動物由来の生物材料、その他、植物、微生物などの動物以外の生物材料を包含する。また、これらの生物から分離した細胞および

培養細胞を含む。さらに、部分精製された核酸も包含する。

【0027】核酸とはDNAまたはRNAを意味する。DNAとしては、2本鎖DNA、1本鎖DNA、プラスミドDNA、ゲノムDNA、cDNAなどを含む。また、RNAとしては、ウイルス、細菌あるいは真菌等の外来性寄生生物由来のRNAに加えて、これらの生物材料を産する生物に由来する内在性のRNAを含み、tRNA、mRNA、rRNAなどを含む。

【0028】上記(a)吸着工程では、核酸結合性担体、核酸を含有する試料および核酸抽出溶液を混合し、核酸を核酸結合性担体に吸着させる。混合方法は、ボルテックスによる攪拌、転倒混和、磁気による攪拌などがあり、混合時間は約1～60分間である。これらの物質を混合することにより、試料中の核酸、タンパク質、糖類などが核酸結合性担体に物理的に吸着する。(b)分離工程における液相と核酸結合性担体との分離手段としては、粒子内の超常磁性金属酸化物を使用することによる、磁石等を用いた簡便な磁気分離法が可能である。

(b)工程では、必要により洗浄を行い、不要なタンパク質、糖類、脂質などを溶離する。洗浄は1回または2回以上行う。(c)溶出工程は、上記(b)工程における核酸が吸着した核酸結合性担体から該核酸を溶出する工程である。このとき回収した核酸は、透析やエタノール沈殿法等の脱塩、濃縮操作を施すことなく、制限酵素やDNAポリメラーゼ等を使用する酵素反応に直接使用することができる。また、必要により増幅した後、核酸プローブ試薬を使用して目的核酸を検出することもできる。

【0029】

【実施例】以下、実施例を挙げることにより、本発明の効果を一層明瞭なものとする。ただし、これらの実施例によって本発明の範囲は限定されるものではない。

【0030】実施例1(試料中の核酸の抽出)

磁性シリカ粒子は、細孔直径が1～200nm、細孔容積が40～2200mm³/g程度まで異なる粒子を4種類準備した。このうち粒子Aおよび粒子Bは本発明の要件を満たすもの、また粒子Cおよび粒子Dは従来型粒子で細孔直径と細孔容積が小さいものである。このほか、これらはすべて平均粒子径の範囲が1.0～5.0μm、四三酸化鉄粒子の含有量がグラム重量あたり30%である。まず、0.1mg/ml濃度になるように5.0mol/lのNaCl溶液に懸濁した磁性シリカ粒子を準備した。各ロット中の磁性シリカ粒子の性質を表1に示す。被験試料としては、耐熱性毒素TDH(Thermostable Direct Haemolysin)を産生する腸炎ビブリオ菌体陽性の全血検体を使用した。また核酸抽出用溶液としては、以下の組成のものを使用した。

50mmol/l トリス-HCl

5.0mol/l グアニジンチオシアン酸塩

20mmol/l EDTA

1. 2% Polyethylene Glycol Mono-p-isooctylphenyl Ether

【0031】本実施例の具体的な操作は次の通りである。

(1) 1.5ml容のエッペンドルフチューブに、上記組成を有する核酸抽出用試薬0.9mlを入れ、次に核酸を含有すると考えられる生物試料0.1mlを添加し、よく混合した。

(2) 次に、5.0mmol/lのNaCl溶液に懸濁した磁性シリカ粒子担体50.0μlを加え、よく混合し室温で10分間放置した。この間2分おきに混合した。

(3) 遠心分離機を使用し、12,000rpmで1分間遠心することにより、粒子をチューブ底部に集めた。

(4) フィルターチップ又はディスポーザブルスポイトを用いて、溶液相を静かに吸引排出した。

(5) ここに、洗浄液として5.0mmol/lのチオシアン酸ナトリウム塩を含むトリス-塩酸緩衝液1.0mlを加え混合した後、上記(3)と同様にして遠心分離した。

(6) 上記(4)と同様に溶液を排出し、洗浄液による洗浄操作をもう一度繰り返した。

(7) 1.0mlの70%エタノール溶液により上記(5)から(6)と同様に、核酸の吸着したシリカ粒子を洗浄し、高濃度の塩溶液を除去した。

(8) 再度1.0mlの70%エタノール溶液で洗浄した後、1.0mlの99%エタノールで同様に洗浄した。

(9) 56.0℃のヒートブロック上に上記のチューブを設置し、約30分間静置することにより、チューブ内およびシリカ粒子中のエタノールを完全に蒸発させて除去した。

(10) 0.1mlの滅菌水を加え、56.0℃のヒートブロック上に上記チューブを静置し10分間静置した。

(11) 12,000rpmで5分間遠心分離することにより粒子をチューブ底部に集め、次いで溶液相をフィルターチップで吸引し、別の新しいチューブに回収した。回収液量は通常60~70μl程度である。

【0032】実施例2 (腸炎ビブリオTDH遺伝子の増幅)

次にこの回収した核酸をNASBA法(Nature 350、91-92(1991)、特許第2648802号公報および特許第2650159号公報)により増幅した。増幅反応は腸炎ビブリオTDH遺伝子の配列中より最適な配列を有する増幅用プライマーを使用した。5'側プライマーの塩基配列が、5'-CCCCGGTTCTGATGAGATAT TGTT-3' (配列番号1)、3'側プライマーの塩基配列が、5'-AATTCTAATACGACTCACTA TAGGGAGACCAATATATTACCACTACCACTA-3' (配列番号2、T7-RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む)である。これらのプライマー配列は特開平4-20299号公報およびGene 93: 9-15 (1993)に開示されているものである。またNASBA法は、T7-RN

Aポリメラーゼ、逆転写酵素およびRNase H (一重鎖または二重鎖RNAまたはDNAを加水分解することなくRNA-DNAハイブリッドのRNAを加水分解するリボヌクレアーゼ)を用いた。

【0033】本実施例の具体的な操作は次の通りである。

(1) 以下に示すような組成の増幅反応液10.0μlを入れたチューブに、実施例1の方法で抽出したTDH遺伝子核酸溶液5.0μlを加えた。

40.0mmol/l トリス-HCl

12.0mmol/l MgCl₂

70.0mmol/l KCl

5.0mmol/l DTT

15% (v/v) DMSO

1.0mmol/l dNTP

2.0mmol/l rNTP

0.2μmolプライマー×2

(2) このチューブを65℃で5分間静置した。

【0034】(3) 次にこのチューブを41℃で5分間静置し、以下に示すような組成の酵素溶液5.0μlを加えた。

0.1U RNase H

40.0U T7-RNAポリメラーゼ

8.0U 逆転写酵素

0.1g/l BSA

(4) このチューブを41℃で90分静置した。

以上の手順により得られた増幅核酸溶液を核酸量評価のため検出に用いた。

【0035】実施例3 (増幅した核酸溶液の検出)

核酸のサンドイッチハイブリダイゼーション法により、腸炎ビブリオTDH遺伝子の検出を行った。本実施例の具体的な操作は次の通りである。

(1) TDH遺伝子検出用捕捉プローブおよび標識プローブの合成

捕捉プローブおよび標識プローブは、DNAシンセサイザー391型 (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、ホスホアミダイト法により合成した。捕捉プローブの塩基配列は、5'-CGGTCATTCTGCTGTTCGTAAAT-3' (配列番号3)、標識プローブの塩基配列は、5'-CAGGTACTAAXGGTTCACATCCTA-3' (配列番号4) である。標識プローブの配列中Xは、5'位にリンカーアームを有するウリジンを示す。これらのプローブは特開平4-20299号公報及びGene 93: 9-15(1993)に開示されているものである。

【0036】(2) 標識プローブの酵素 (アルカリフォスファターゼ) 標識

合成標識プローブと、そのリンカーアームを介してのアルカリフォスファターゼとの結合を、文献 (Nucleic Acids Research, 14, 6155, 1986) の記載に従って行った。

(3) 捕捉プローブ-固相の調製法

固相はポリスチレン製のマイクロタイタープレート（マイクロライト2、ダイネックス社製）を用い、上記方法で得られた捕捉プローブを、マイクロプレートウェルに100 μ lずつ分注し、25℃で一夜インキュベートし、捕捉プローブをプレートに結合させた後、デオキシリボヌクレオチド三リン酸によりブロックした。

【0037】(4)サンドイッチハイブリダイゼーション法による核酸の検出

以上の方法で調製した試薬および試料を用いて、核酸溶液の検出を以下に述べる方法で行った。

(4-1)得られた核酸溶液を、水酸化ナトリウム溶液で処理して変性させた。

(4-2)そして上記プレートに、変性させた試料を2.0 μ l、ハイブリダイゼーション緩衝液を50.0 μ l、アルカリフォスファターゼ標識プローブ溶液を50.0 μ l加え、50℃で30分間ハイブリダイゼーションを行った。

(4-3)マイクロプレートウェルから液を除き、1.0%ラウリル硫酸ナトリウムを含む洗浄液1を200 μ l加え、50℃で5分間洗浄した。

(4-4)次に0.5% Polyethylene Glycol Mono-p-isooctylphenyl Etherを含む洗浄液2を200 μ l加え室温で5分間洗浄後、さらに1 \times SSC溶液200 μ lで洗浄した。

(4-5)そして、アルカリフォスファターゼの基質であるLumiphos480（和光純薬社製）を100 μ l加え、37℃で15分間酵素反応を行った後、発光量をマイクロライト1000（ダイナテック社製）で測定した。実施例1～3の結果を以下の表2に示す。

【0038】

【表1】

表1：各磁性シリカ粒子の性質

	粒子A	粒子B	粒子C	粒子D
細孔直径 (nm)	193.0	98.0	1.08	2.12
細孔容積 (mm ³ /g)	418.0	2119.0	116.0	41.7
平均粒子径 (μ m)	4.80	1.88	4.80	3.06

【0039】

【表2】

表2：各磁性シリカ粒子による核酸測定量の比較

希釈系列	粒子A	粒子B	粒子C	粒子D
10 ⁻⁵	10.9	18.2	1.0	0.9
10 ⁻⁴	45.8	64.4	6.4	4.1
10 ⁻³	728.1	1128.2	52.1	39.7

発光量 (r l u)

【0040】表2から明白なように、本発明の粒子である粒子Aおよび粒子Bを使用した場合には、従来型粒子である粒子Cおよび粒子Dと比較して格段の差がみられる。10⁻³希釈付近の核酸量の多い試料においてはより

高い測定値を示している。また10⁻⁵希釈付近の低濃度域でも、粒子Aおよび粒子Bではシグナルがみられるが、粒子CおよびDではブランクとほぼ同じ程度のシグナル（1.0rlu以下）であり、検出感度に差があることがわかる。

【0041】実施例4（各磁性粒子と核酸回収量の比較）

上記と同様粒子AからDを使用し、あらかじめ増幅することによって数的に増大させた核酸溶液を用いて、実施例1の方法で核酸を抽出し、実施例3の方法で検出量を測定した。被験試料としては、実施例2の方法（NASBA法）で増幅したTDH遺伝子の核酸溶液を使用した。また検体として、TDH遺伝子陰性の血清サンプルならびに全血サンプルを用い、ここに増幅核酸溶液を添加したものを使用した。そして抽出し検出した核酸の検出量を、添加した核酸量の検出値で割ることにより回収率として算出した。ここで全ての評価は2テストずつ実施した。実施例4の結果を、以下の表3に示す。

【0042】

【表3】

表3：各磁性シリカ粒子による核酸測定量の比較

回収率 (%)	粒子A	粒子B	粒子C	粒子D
血清サンプル1	63.9	64.4	20.3	30.2
血清サンプル2	60.2	57.8	24.1	24.8
全血サンプル1	27.8	30.6	4.04	2.48
全血サンプル2	28.1	32.2	3.67	2.71

【0043】表3から明白なように、本発明の粒子を使用することにより、核酸の回収効率は飛躍的に向上した。本発明の粒子Aおよび粒子Bでは、血清サンプルでの評価において従来型粒子（粒子Cおよび粒子D）の約2倍の回収効率を示している。また全血サンプルにおいては、本発明の粒子2種の方がおよそ一桁の差を回収効率の面で示しており、本発明において用いられる粒子が優れていることが示される。

【0044】比較例（細孔直径が500nm、細孔容積が5000mm³/gよりも大きい場合）

本発明において、使用する磁性粒子が500nmよりも大きい細孔直径および/または5000mm³/gよりも大きい細孔容積を有する場合には、粒子内部の空隙が大きくなりすぎ、核酸以外の夾雑物が多量に粒子内部に留まる可能性があるため好ましくないことが考えられる。加えて500nmよりも大きい細孔直径は、粒子直径のかなりの部分を占めるため、粒子自体が脆くなり構造を維持できない可能性がある。従って、本発明の方法においては、上述したように50～500nmの細孔直径、200～5000mm³/gの細孔容積ならびに0.5～15.0 μ mの粒子直径を有する磁性粒子を使用する必要がある。

【0045】

【発明の効果】上述したように、本発明における表面細

孔直径50～500nm、細孔容積200～5000m³/g、および粒子直径0.5～15.0μmである核酸結合性磁性シリカ粒子担体を使用することで、生物材料から高い回収率で核酸を抽出および単離することが可能となる。特に、全血試料のような夾雑物質を多量に

含む材料からの核酸抽出においては、従来の粒子担体と比べて飛躍的な効果がみられるという利点を有する。

【0046】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：24

配列の形：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..24

特徴を決定した方法：S

他の特徴：腸炎ビブリオTDH (Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の102番目から125番目のヌクレオチド配列と相同的な配列を有する。

配列

CCCCGGTTCT GATGAGATAT TGTT

24

【0047】

配列番号：2

配列の長さ：51

配列の形：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..51

特徴を決定した方法：S

他の特徴：腸炎ビブリオTDH (Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の495番目から518番目のヌクレオチド配列と相補的な配列を有する。またT7-RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有する。

配列

AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGACC AATATATTAC CACTACCACT A

51

【0048】

配列番号：3

配列の長さ：26

配列の形：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..26

特徴を決定した方法：S

他の特徴：腸炎ビブリオTDH (Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の339番目から364番目のヌクレオチド配列と相同的な配列を有する。

配列

CGGTCATTCT GCTGTGTTGG TAAAT

26

【0049】

配列番号：4

配列の長さ：24

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列の特徴

存在位置: 1..24

特徴を決定した方法: S

他の特徴: 腸炎ビブリオTDH (Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の
254番目から277番目のヌクレオチド配列と相同的な配列を有する。

配列

CAGGTACTAA AXGGTTGACA TCCT